Feel so science キットシリーズ

#014 遺伝子組換え原理探究実験キット

取扱説明書

1-100-014

目次

本キットの特徴 ･･･ 2

遺伝子組換え実験を始める前に ･･･ 3

キット使用時に必要な試薬･機材等の一覧 ･･･ 4

内容物について ･･･ 5

事前準備 ･･･ 7

実験手順 ･･･ 11

指導のポイント ･･･ 14

片付け ･･･ 14

付録 1 大腸菌の遺伝子組換え ･･･ 15

付録 2 遺伝子組換え法の実際 ･･･ 18

付録 3 遺伝子組換え実験における注意点 ･･･ 20

付録 4 KikG、KikGR の遺伝子配列比較シート ･･･ 23

本キットの特徴

本キットは、大腸菌に GFP（Green Fluorescent Protein；緑色蛍光タンパク質）遺伝子を持つプラスミドDNAを形質転換することにより遺伝子組換え大腸菌を作出する実験キットです。

独立行政法人理化学研究所の宮脇敦史博士のご協力により完成した、これまでにない新しい遺伝子組換えキットです。

GFPとは緑色に蛍光を発するタンパク質の総称ですが、本キットでは、2008年にノーベル賞を受賞したオワンクラゲのものとは異なる Kikume Green （KikG）, Kikume Green-Red （KikGR）と呼ばれるタンパク質を利用します。KikG 遺伝子は宮脇敦史博士らの研究グループによってキクメイシ（*Favia favus*） サンゴから同定されました。また、KikGR遺伝子は、宮脇博士らのグループによって KikG 遺伝子を人工的に改良することで作り出された遺伝子です。これらの遺伝子を大腸菌に組換えることで、光る大腸菌を作出します。KikG を人工的に改良した蛍光タンパク質 KikGR は、紫（外）光（太陽光）を照射することにより、緑色から赤色に蛍光を変化させます。

本キットを用いることで、遺伝子組換え、セントラルドグマ、生物蛍光について学習することが可能です。また、付録4を用いて、KikG と KikGR の遺伝子配列の違いを調べ、遺伝子配列の違いと蛍光タンパク質の色変化の関係を学ぶことができます。

遺伝子組換え実験を始める前に

遺伝子組換え実験を行う際は、遺伝子組換え実験指針別表 4 に記載されているように、**以下の項目を守って実験を行ってください。**

1) 実験中は、実験室の窓及び扉は閉じておくこと。
2) 実験室内での飲食、喫煙又は食品の保存はしないこと。
3) 組換え体を取扱い後又は実験室を出るときは、手を洗うこと。
4) 機械式ピペットの使用が望ましい。また、口を使うピペット操作は行わないこと。
5) 組換え体の保管又は運搬を行う場合は、他の微生物又は組換え体と混同しないように管理すること。
6) 実験終了後は煮沸又は消毒液の投入等の措置により、組換え体を滅菌すること。
7) 組換え体の付着した器具等は、消毒又は滅菌すること。
8) 実験室は整理し、清潔を保つこと。
9) その他実験指導者の定める事項を遵守すること。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容 : 生徒 20 名（4 人 1 班、実験は 2 人 1 組を推奨）

・大腸菌グリセロールストック	400 µl
・プラスミド DNA （KikG）	60 µl
・プラスミド DNA （KikGR）	60 µl
・アンピシリン溶液	250 µl
・IPTG 溶液	250µl
・形質転換溶液	1.2 ml
・LB 液体培地（100ml 用）	1 包
・LB 寒天培地（500ml 用）	1 包
・滅菌シャーレ	20 枚 （1 包）
・ループ	50 本
・マイクロチューブ	50 本
・オートクレーブバッグ	2 袋
・取扱説明書 （本書）	1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧※1

・消毒用エタノール（70 %）		500 ml 程度
・蒸留水		適量（培地作製用）
・インキュベーター（37°C に設定できるもの）		1 台
・恒温槽（42°C のお湯）		1 台
・フロート		5 個（各班 1 個）
・オートクレーブ （あるいは圧力鍋および電子レンジ）		1 台
・携帯型ブラックライト（または青緑色発光ダイオード）		5 個 （各班 1 個）
・マイクロピペット	20 µl 用	5 本 （各班 1 本）
	200 µl 用	5 本 （各班 1 本）
・マイクロピペット用チップ		5 箱 （各班 1 箱）
・アイスボックス（氷水入れ）		5 個 （各班 1 本）
・クラッシュアイス		適量
・ビーカー（1 L、300 ml）		1 個ずつ
・メスシリンダー（500 ml）		1 個

※1 機材につきましては弊社で販売およびレンタル（有料）を行っております。ご入用の際にはお問合せください。

内容物について

大腸菌グリセロールストック

LB 培地で培養した大腸菌（*Escherichia coli* DH-5α株）にグリセロールを加え冷凍保存したものです。DH-5α株は研究用として扱われる安全な菌株です。使用直前まで-20°C で保存し、ご使用の際には必ず氷上にて融解してください。

＊到着時、すでに溶解していた場合はカスタマーサポート係にご連絡ください。

プラスミド DNA

KikG、KikGR 遺伝子および β ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）をもつプラスミド DNA です。-20°C にて保存し、ご使用の際には必ず氷上にて融解してください。

アンピシリン溶液

ペニシリン系抗生物質の一種です。100 mg/ml に調整してあります。LB 寒天培地の作成時に加えてください。-20°C にて保存してください。

IPTG 溶液

イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside）溶液。25mg/ml に調整してあります。LB 寒天培地の作成時に加えてください。-20°C にて保存してください。

形質転換溶液

LB 液体培地に有機溶媒を加えたもので、形質転換を起こりやすくする溶液です。-20°C にて保存してください。

LB 寒天培地および液体培地

大腸菌などを培養する一般的な培地です。寒天培地は 1 袋で 500 ml、液体培地は 1 袋で 100 ml が作成できます。開封前は常温にて保存してください。培地作成時にはビーカー内で蒸留水と混ぜ、アルミホイルでふたをした後オートクレーブ（121°C、20 分）を行い溶解させます。作成した培地は 4°C で保存し、1 か月以内にお使いください。

滅菌シャーレ

滅菌済み小型シャーレです。オートクレーブした LB 培地を流し、培地

を作成します。培地作成前は常温で保存してください。

ループ

大腸菌の植菌や操作、プラスミドDNAを形質転換溶液に加える際に使用する滅菌済みループです。常温で保存してください。開封後はループ部分を素手で触らないよう注意してください。

マイクロチューブ

形質転換の作業を行う際に主に使用する滅菌済みチューブです。常温にて保存してください。開封後はほこりや菌が付着するような環境を避けて下さい。

オートクレーブバッグ

使用後のシャーレやループ、チューブをオートクレーブ滅菌する際に使用するバッグです。実験中に使用した器具やシャーレなどは、この袋に集め、実験後にオートクレーブ処理によって滅菌してください。常温にて保存してください。

事前準備

本実験キットでは４人１班（実験は２人１組）を推奨しています。

実験前の準備

●LB 培地の作成 （授業の 2～5 日前）

1）ＬＢ寒天培地の作成

＜用意するもの：ＬＢ寒天培地１包・蒸留水 500 ml・1 Ｌビーカー１つ・ビニールテープ・オートクレーブまたは電子レンジ・クリーンベンチまたはガスバーナー・70 ％エタノール＞

1. LB 寒天培地を開封し、1 L ビーカーに全量を加えます。
2. 蒸留水を 500 ml 加えて良く撹拌し、培地を懸濁します（中に含まれる寒天はこの段階では溶解しません）。
3. ビーカーの口をアルミホイルで軽くふたをし、121°C、20 分以上のオートクレーブ処理をした後、60°C 程度まで冷まします[*1]。
4. クリーンベンチ内[*2]でシャーレを開封し、LB 寒天培地を作成します。培地をシャーレの 1/2 の高さまで加え、蓋を閉めて培地が固まるまで待ちます。シャーレの底には「LB 培地」と記載してください。
5. 培地が固まったら、パラフィルムやビニールテープなどで蓋が開かないよう固定します。LB 培地は冷蔵庫にて保存してください。余った培地は固めて燃えるごみとして処理してください。

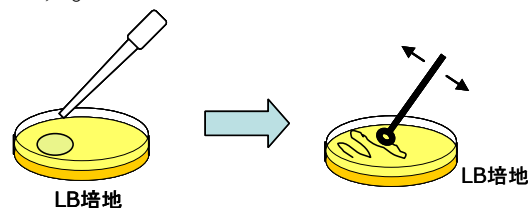
2） LB 液体培地の作成

＜用意するもの：ＬＢ液体培地１包・蒸留水 100 ml・300 ml ビーカー１つ・オートクレーブまたは電子レンジ・クリーンベンチまたはガスバーナー・70％エタノール＞

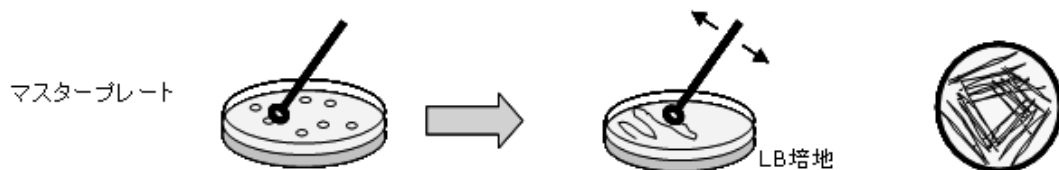
1. LB 液体培地を開封し、300 ml ビーカーに全量を加えます。
2. 蒸留水を 100 ml 加えてよく撹拌し、培地を完全に溶解します。
3. ビーカーの口をアルミホイルで軽くふたをし、121°C、20分でオートクレーブ処理をした後、室温まで冷ましてから冷蔵庫にて保存します。[*1] 当日までに、マイクロチューブに 250 µl ずつ 10 本分注しておきます。余った培地は流しに捨てて下さい。

●大腸菌マスタープレートの作成（授業の 2 日以上前）

＜用意するもの：作製したLB寒天培地1つ・大腸菌グリセロールストック1つ・ループ1本・200 マイクロピペット 200 μl 用1つ・クリーンベンチまたはガスバーナー・70％エタノール＞

1. クリーンベンチ内で大腸菌グリセロールストックを開封し、25 μl をLB寒天培地１枚にのせ、ループでなでるようにして培地全体に伸ばします。強くループを押し付けると LB 寒天培地が破損しますので、注意してください。
2. 37°C のインキュベーターで上記1. のプレートを一晩培養し、大腸菌を増殖させます。

●大腸菌プレートの作成（授業の 1~2 日前）

＜用意するもの：LB寒天培地 5 つ・マスタープレート1つ・ループ 5 本・クリーンベンチまたはガスバーナー・70％エタノール＞

1. クリーンベンチ内[*2]でマスタープレートを開封します。
2. ループで大腸菌のコロニーを 1～2 個すくい取り、作成した LB 固形培地に植菌します。下図右のように、何度か LB 寒天培地を回転させながら大腸菌をすくったループを往復させます。強くループを押し付けると LB 寒天培地が破損しますので、注意してください。これを繰り返し、大腸菌プレートを 5 枚作成します。
3. 37°C のインキュベーターで一晩、大腸菌を培養します。

[*1]:ビーカーの口をビニルラップで軽くふたをし、電子レンジにて寒天の粒子がなくなるまで繰り返し沸騰させて溶解してもかまいません。ただし細菌類や真菌類の胞子は死滅しにくいため、コンタミネーションの可能性があります。
[*2]:通常の実験台でも、実験台を 70％エタノールでよく消毒し、ガスバーナーを焚いて落下菌を防ぐことでコンタミネーションを大幅に減らすことができます。

●実験直前の準備

- アイスボックスもしくは発砲スチロール

  ⇒班数分用意し、氷を詰めておきます。
- 試薬の分注

  ⇒以下のように分注後、チューブを氷にさして冷やしておきます。
  - プラスミド DNA(KikG または KikGR)をマイクロチューブに 11 µl ずつそれぞれ 5 本分注
  - 形質転換溶液をマイクロチューブに 100 µl ずつ 10 本分注
  - LB 液体培地をマイクロチューブに 250 µl ずつ 10 本分注
  - アンピシリン溶液をマイクロチューブに 25µl ずつ 10 本分注
  - IPTG 溶液をマイクロチューブに 50µl ずつ 5 本分注
- LB 培地の乾燥

  ⇒実験で使用する前に、LB 培地を乾燥させます。クリーンベンチの中で蓋を半分開け、1 時間程度放置します。通常の実験台で行う場合は、実験台を 70%エタノールでよく消毒し、ガスバーナーを焚いた周辺で蓋を開けてください。上からアルミホイルやサランラップで蓋をすることで、落下菌のコンタミネーションを大幅に減らせます。
- 各班への配布

  ⇒大腸菌プレート 1 枚、LB 寒天培地 2 枚、プラスミド DNA 11 µl× 2 本、 形質転換溶液 100 µl × 2 本、LB 液体培地 250 µl × 2 本、アンピシリン溶液 25µl × 2 本、IPTG 溶液 50µl × 1本、フロート 1 個、ループ 5 本を配布します。

実験当日の試薬・機材（1 班分）

1 日目

形質転換溶液	… 100 µl × 2 本
プラスミド DNA（KikG または KikGR）	… 11 µl× 2 本
アンピシリン溶液	…25µl× 2 本
IPTG 溶液	…50µl
大腸菌プレート	… 1 枚
LB 液体培地	… 250 µl × 2 本
LB 寒天培地	… 2 枚
ループ	… 5 本
マイクロピペット 20 µl 用	… 1 本
200 µl 用	… 1 本
マイクロピペット用チップ	… 1 箱
氷水	… 1 個
（以下 2 つは教室全体で 1 セット）	
37°C 培養装置	… 1 台
恒温槽	… 1 台

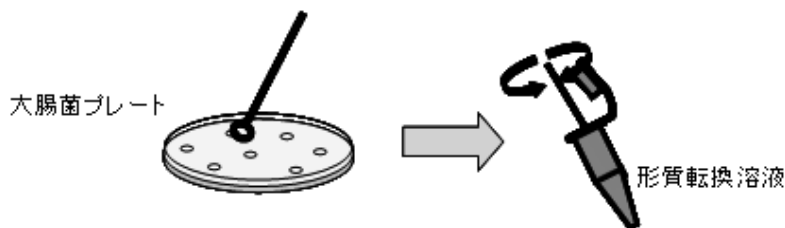
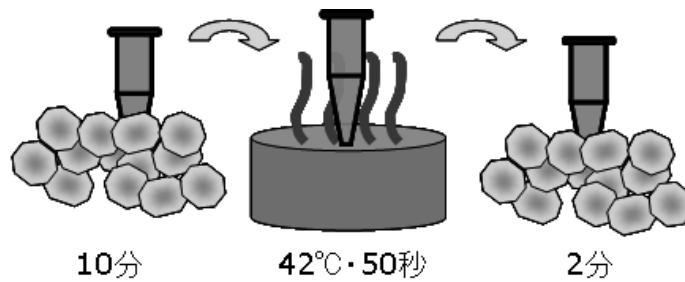
2 日目

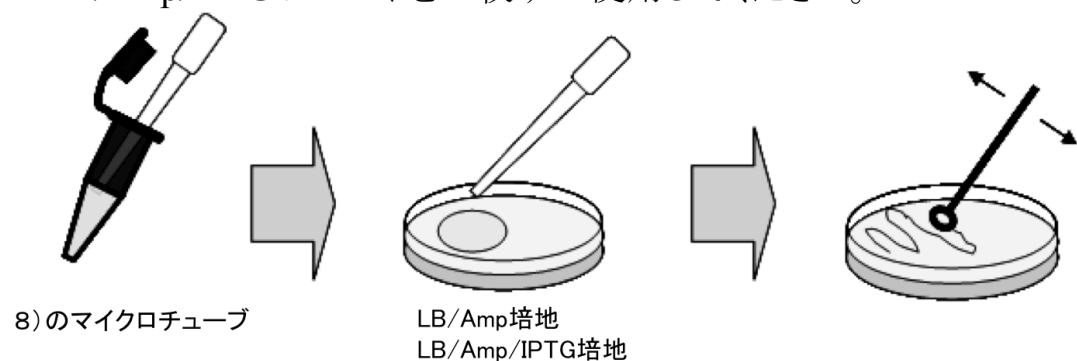
携帯型ブラックライト（またはトランスイルミネーター*） … 1 個

*Invitrogen 社の E-Gel® Safe Imager™ Real-Time Transilluminator などがおすすめです。

実験手順

実験 1 日目

1) LB 寒天培地にアンピシリン溶液 25µl を添加します。ループを使って、何度か LB 寒天培地を回転させながらアンピシリン溶液を全体に塗り広げます。強くループを押し付けると LB 寒天培地が破損しますので、注意してください。シャーレの底には「LB/Amp」と記載してください。
2) アンピシリン溶液を塗り広げた寒天培地の片方のみに、IPTG 溶液を 50µl 添加し、同様にループを使って塗り広げてください。シャーレの底には「LB/Amp/IPTG」と記載してください。
3) 大腸菌プレートのコロニーを 1～2 個ループですくい取り、形質転換溶液が入ったマイクロチューブに塊が残らないよう、ループを使ってよく懸濁して、溶液を氷上に静置します。(液体が白く濁るのを確認してください。足りない場合は再度コロニーを取って懸濁してください。)これを 2 本分行います。

4) 上記3)のマイクロチューブにプラスミド DNA を 10 µl ずつ加えます。(班単位で担当を決めてそれぞれプラスミド溶液を形質転換溶液へ加えてください。KikG：2班、KikGR：2班に分かれて進めることをお勧めします。どちらの DNA を入れたかがわかるよう、マイクロチューブに油性ペンで印をつけておきます。)懸濁した大腸菌は細胞膜が壊れ、弱っている状態ですので、ここに DNA を加えることで DNA が大腸菌内へ取り込まれやすくなります。
5) マイクロチューブを氷上に戻し、10 分静置します。
6) 静置後、マイクロチューブを 42°C(正確に設定してください)のお湯に 50 秒間浸し、ヒートショックを行います。
7) マイクロチューブをすばやく氷上に戻し、2 分静置します。

8）氷上からマイクロチューブを取り出し、LB 液体培地 250 µl を加えて 10 分間室温にて静置します。

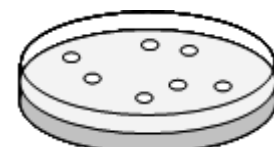
9）上記8）の溶液 100 µl を LB 寒天培地上にのせ、新しいループを用いて薄く溶液を伸ばします[*1]。それぞれ LB/Amp プレートと LB/Amp/IPTG プレートを 1 枚ずつ使用してください。

10）培地の表面が完全に乾くまで待ちます。完全に乾いたらシャーレの蓋を閉め、過度な乾燥を避けるため、パラフィルムやビニールテープ、ビニルラップなどで蓋を固定して 37°C のインキュベーターに入れます[*2]。16 時間程度培養し、1つのコロニーのサイズが 2 mm 程度になったところでインキュベーターから出し、4℃で保管して下さい。蛍光を見やすくするため、培養開始から2 日ほどたってから＜実験 2 日目＞の作業を行うことを推奨いたします。

*2 シャーレは上下逆にし、蓋を下にして入れてください。蓋からの菌や水滴の落下によるコンタミネーションを防ぐことができます。実験が終了したら、使用した大腸菌は冷蔵庫で保存しておき、結果観察の際に比較対象として使用して下さい。

実験 2 日目

実験直前の準備

・実験室に光が入らないよう、黒いカーテンなどで明かりを遮断します。

1）前日作成したプレートをインキュベーターから取り出し、コロニーを観察します。図のようなコロニーが形成されて

いれば、成功です。
蛍光灯の光にも KikG, KikGR を励起する波長が含まれているため、組換えが成功したコロニーは蛍光灯下でもやや緑色に見えます。

2) 照明を消し、励起用光源のスイッチを入れてプレートにかざします。

考察の際に重要な点は以下 3 点です。
- 前日使用した大腸菌プレートでは蛍光が観察されないことを確認してください。
- LB/Amp プレートではコロニーは形成されますが、蛍光は観察されないことを確認してください。
- LB/Amp/IPTG プレートではコロニーが形成され、蛍光が観察されることを確認してください。

※ 発光が弱い場合には、培養したプレートを 4℃で一晩保存し、翌日同じようにして観察してください（特に、KikGR の発現は KikG よりもやや時間がかかる場合があります）。

3) 次に、KikG、KikGR それぞれのプレートを太陽光に 10 分以上当てた後に、励起光で再び観察してください。KikGR を発現している大腸菌プレートでは、色変化（緑から赤）を観察することができます。

4) 実験後は作成したプレートはすべてオートクレーブバッグに入れ、オートクレーブにて滅菌（121℃、20 分間）してください[*5]。

[*5] この作業は圧力鍋を用いても構いません。圧力鍋の圧力が十分に上がってから 20 分以上を目安に滅菌作業を行ってください。圧力鍋は本実験用に用意し、家庭や学校などで日常使用している圧力鍋は用いないでください。

指導のポイント

暗室をつくる

2 日目の実験では、観察できる光は淡く弱いため、部屋をできる限り暗くする必要があります（暗幕を閉め、電気を消し、目が慣れたときに手元がぼんやり見える程度）。また、電気を消している間は危険ですのでむやみに立ち歩かないよう指導してください。

コンタミネーションを避ける

大腸菌のプレートや試薬に他の菌が混ざらないよう、実験前に手をよく洗い、70％エタノールで殺菌するよう指示して下さい。また、使用する机も 70％エタノールで殺菌し、殺菌後はなるべく私語は避けるようにして下さい。さらに、使用する器具の試薬や大腸菌に触れる部位は、素手で触らないように注意して下さい。

大腸菌に素手で触れない

教育用に用いられる大腸菌は病原性のない安全な菌株ですが、皮膚や衣服に触れないようにして注意して下さい。万が一触れた場合は 70 ％エタノールで殺菌してから、水で洗い流して下さい。

器具・試薬の処理

使用した使い捨て器具・試薬は机の上などに置かず、全てオートクレーブバッグに入れて下さい。また、実験後に手や机を 70％エタノールで殺菌して下さい。

片付け

実験で使用した使い捨て器具・試薬は全てオートクレーブバッグに入れ、袋の口を縛ってから 121°C で 20 分以上滅菌して下さい。滅菌後は、自治体の指示に従って廃棄してください。

大腸菌に触れていない培地等は、普通ゴミとして廃棄可能です。

付録 1 大腸菌の遺伝子組換え

遺伝子組換えとは

遺伝子組換え法は、植物細胞や動物細胞、細菌類などに外来の遺伝子を導入する方法です。遺伝子組換え法が開発されたのは 30 年ほど前ですが、いまでは基礎研究・農業・医療などさまざまな分野で応用され、将来は人々の暮らしを支える技術になると注目されています。ただし、生態系や人体への影響を懸念する声もあるため、現在もその影響を調べる研究が続けられています。

大腸菌の遺伝子組換え

大腸菌の遺伝子組換えを行う際には、プラスミド DNA とよばれる、環状の DNA がよく用いられます。プラスミド DNA は、細菌類などがゲノム DNA 以外に持つ、いくつかの遺伝子がコードされた環状の DNA で、菌体内では複数コピー（数コピー～数百コピー）のプラスミドが保持されています。遺伝子組換えに使用されるプラスミド DNA には抗生物質抵抗性遺伝子がコードされており、抗生物質の存在下ではプラスミド DNA が保持され、プラスミド DNA を持つ大腸菌のみが選択されて生育します。この性質を利用し、プラスミド DNA に制限酵素処理（Feel so science キットシリーズ＃004 参照）などで目的の DNA 配列を組換え、適切な抗生物質を含む培地で生育させると、遺伝子から発現したタンパク質を取得したり、また大量に得たプラスミド DNA から未知の DNA 配列を解読することができます。

大腸菌へのプラスミド **DNA** の導入

大腸菌へプラスミド DNA を導入するためには、ヒートショック法とよばれる方法が用いられます。この方法では、まず塩化カルシウムなどで大腸菌を処理して膜の透過性を高めます（この状態の大腸菌をコンピテントセルと呼びます）。そこにプラスミド DNA を懸濁して氷上にしばらく置いた後、42°C で 50 秒間の熱ショックを与えることで、菌体内へプラスミド DNA を取り込ませます。このヒートショック法は大腸菌にプラスミドを取り込ませる際の方法として最もポピュラーなものですが、なぜ熱ショックを与えることで大腸菌がプラスミド DNA を取り込むことができるのか、そのメカニズムはあまり詳しくわかっていません。

本キットで使用するプラスミド DNA

本キットでは、抗生物質の一種アンピシリンに耐性の形質を示す β ラクタマーゼ遺伝子と、サンゴの発光に関わる KikG, KikGR 遺伝子をコードしたプラスミド DNA を使用します。KikG,KikGR 遺伝子の発現は IPTG の存在下でのみ誘導されます。

β ラクタマーゼについて

抗生物質は、カビなどが細菌類を駆除するために産生する化学物質で、1929 年に初めて発見されました。抗生物質にはペニシリン系、テトラサイクリン系などさまざまな種類がありますが、今回使用するアンピシリンはペニシリン系の抗生物質です。アンピシリンは β ラクタム環とよばれる構造を持ち、β ラクタム環を活性中心として細菌の細胞壁合成を阻害することで、細菌の増殖を抑えます。β ラクタマーゼは、この β ラクタム環を分解するため、この遺伝子を持つ細菌はアンピシリン存在下でも生育が可能です。

GFP（Green Fluorescent Protein）について

GFP は緑色の蛍光を発するタンパク質の総称で、最も有名で研究にも頻繁に用いられているのは、オワンクラゲがもつ GFP です。本キットにて用いる蛍光タンパク質は、Kikume Green （KikG），Kikume Green-Red （KikGR）といい、キクメイシサンゴ（*Favia favus*）からクローニングされた蛍光タンパク質 KikG と、人工的に改良を加えた蛍光タンパク質 KikGR です。480 nm～520 nm で励起され（ピーク波長 507 nm）、517 nm の緑色の蛍光を発します。KikGR は、紫（外）光を照射することにより、緑から赤（励起ピーク波長 : 360 および 583 nm　蛍光ピーク波長 : 593 nm）に蛍光を変化させます。

本キットでは、蛍光タンパク質遺伝子（KikG, KikGR）を持つプラスミド DNA を大腸菌へ導入することで大腸菌が発光する現象を観察することができ、KikGR においては発現後に紫（外）光を照射することで色変化を観察することができます。一方、プラスミド DNA を導入しなかった大腸菌では発光を観察することはできません。

また、蛍光タンパク質は、最先端の研究で非常に多く用いられています。一般的な利用としては、生物体内の筋肉や細胞内のゴルジ体などの目的の器官やタンパク質だけを標識することです。本キットで用いている KikGR のように、色変化をする蛍光タンパク質の場合は、1 つの細

胞だけに紫(外)光を照射することで、蛍光タンパク質を発現している数多くの細胞群の中から着目した細胞だけを見分けることが可能になります(参考文献を参照するとより詳細を知ることができます。参考文献は、インターネットを利用して検索サイトなどからの検索により入手可能です)。

(参考文献)

Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter.
Tsutsui H, Karasawa S, Shimizu H, Nukina N, Miyawaki A.
EMBO Rep. 2005 Mar;6(3):233-8.

付録 2　遺伝子組換え法の実際

遺伝子組換え技術は主に、3 つの主要な技術から成り立っています。この 3 つとは、「目的の遺伝子を見つける」、「目的の遺伝子を取り出す」、「目的の遺伝子を再び導入する」のことです。以下にこれらの技術について詳しく述べていきます。

1）遺伝子を見つける

遺伝子を見つけるには大きく分けて 2 つの方法があります。ひとつめは、変異体を用いた解析によって見つける方法です。変異体の DNA と正常な個体（野生型）の DNA とを比較し、両者が違うところを見つけ出すことで、その変異の原因となる遺伝子を見つけることができます。

もうひとつの方法では、ある生き物が持つ DNA の全塩基配列を解読することから始めます。その後、遺伝子情報データベースから目的の遺伝子と似た機能を持つ遺伝子の配列を検索し、同様の配列が解読した DNA 中にあるかどうかを調べます。この方法は、塩基配列の解読スピードが近年になって急速に上がったことで可能になりました。

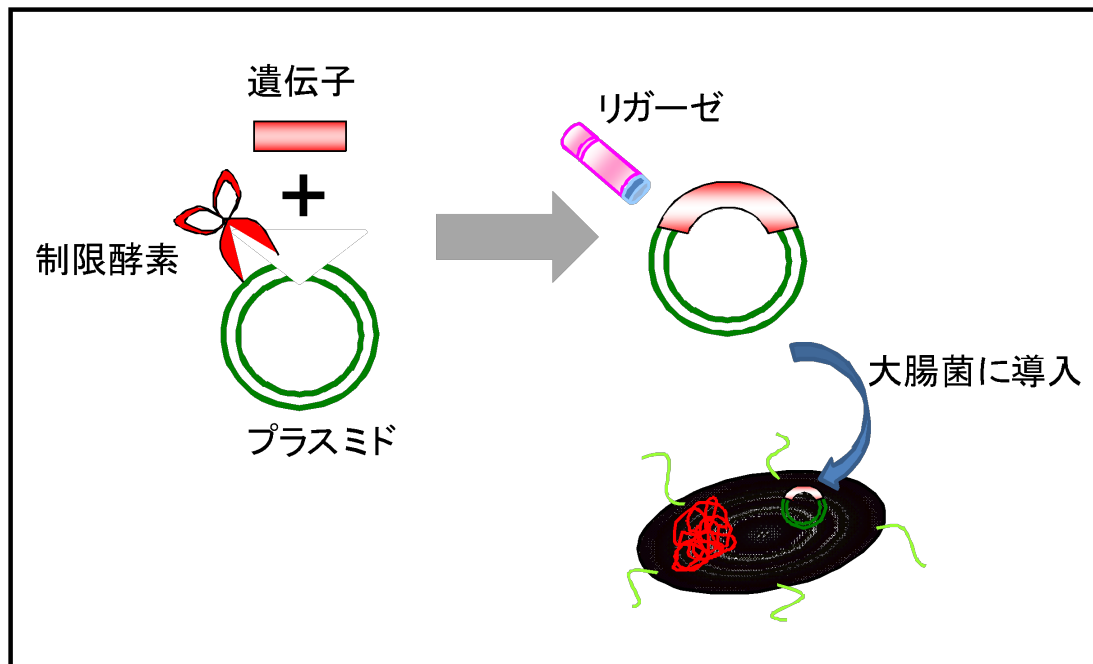
2）遺伝子を取り出す

1)のようにして見つけ出された目的の遺伝子を、その生物から取り出します。そのためには PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）という手法（Feel so Science キットシリーズ#003 参照）を用いて、長い DNA の中から目的部分だけを大量に増幅、精製します。

3）遺伝子を導入する

2)の方法によって取り出された目的の遺伝子は、そのままの形で大腸菌に導入すると、分解されてしまいます。そこで、大腸菌がもともと持っているプラスミド DNA と呼ばれる短い環状の DNA に組み込んでから導入します。

プラスミド DNA に遺伝子を組み込むために、DNA を切断する制限酵素（Feel so Science キットシリーズ#004 参照）と、DNA を結合する DNA リガーゼという酵素（Feel so Science キットシリーズ#005 参照）を用います。

このプラスミドを目的の生物に導入する方法は、目的の遺伝子、導入する生物種によって、本キットで用いるヒートショック法のほか、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法などさまざまな方法があります。

付録 3　遺伝子組換え実験における注意点

遺伝子組換え実験は、カルタヘナ議定書の締結に伴い平成 16 年 2 月 19 日より施行されている、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下法律）によって安全確保が図られています。教育目的で行われる遺伝子組換え実験は法律においては第二種使用等に該当し、その実施については特別な規定は設けられていませんが、「遺伝子組換え実験指針別表7に定められた組合せである遺伝子組換え生物等又はこれと同等に安全管理の容易なものを用いる等安全上の観点から十分に配慮された実験として行うこと」が求められています。以下の項目を遵守したうえで本キットをお使いいただけますよう、お願い申し上げます。

以下は遺伝子組換え実験指針の抜粋となります。

第 8 章　教育目的組換え DNA 実験

教育目的組換え DNA 実験については、別表7の宿主ーベクター系及び供与 DNA の組合せを用いることとし*1、この指針の他の規定にかかわらず、安全確保に関する次の措置をとることによって実施することができるものとする。

第 1 実験の指導

この指針に示される実験の安全確保に関する考え方を理解しており、かつ、実験を実施した経験を有する者が実験指導者となるものとし、当該実験指導者が次の任務を果たすものとする。

1. 実験の実施について、あらかじめ、実験指導者が所属する機関の長及び当該実験に使用する実験室が設置されている機関の長の同意を得ること。
2. 実験従事者を適切に指導するとともに、実験全体の管理及び監督に当たること。
3. 実験従事者の名簿、実験場所、実験日時、実験に用いる宿主ーベクター系及び供与 DNA 並びに組換え体の廃棄の方法を記載した

記録を作成し、保存すること。

4. 実験に用いる宿主－ベクター系及び供与 DNA が別表7に掲げるものであることを実験実施前に確認すること。

　また、遺伝子組換え実験指針では別表4により実験の方法が規定されていましたが、法律では第4条第1号及び第5条第1号の規定により、同省令別表第2第1号に掲げるP1レベルの拡散防止措置を執ること
が義務付けられます。 以下にその説明を述べます。

別表

一. P1レベル

イ 施設等について、実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。

ロ 遺伝子組換え実験の実施に当たり、次に掲げる事項を遵守すること。

(1) 遺伝子組換え生物等を含む廃棄物（廃液を含む。以下同じ。）については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。

(2) 遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用（あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。以下「廃棄等」という。）の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。

(3) 実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。

(4) 実験室の扉については、閉じておくこと（実験室に出入りするときを除く）。

(5) 実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。

(6) すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。

(7) 実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときその他の実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等が漏出その他拡散しない構造の容器に入れること。

(8) 遺伝子組換え生物等を取り扱う者に当該遺伝子組換え生物等が付着し、又は感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。

(9) 実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。

*[1] 本キットで用いられる宿主-ベクター系は、別表 7 によって定められたものに該当します。

付録 4　KikG、KikGR の遺伝子配列比較シート

※拡大コピーし(2 倍)、生徒さん一人ひとりに配布して、遺伝子配列の比較を行うことができます。

```
KikG          ATGAGTGTGATTACATCAGAAATGAAGATGGAGCTGCGTATGGAAGGCGCTGTAAACGGG
KikGR         ATGAGTGTGATTACATCAGAAATGAAGATCGAGCTGCGTATGGAAGGCGCTGTAAACGGG

KikG          CACAAGTTCGTGATTACAGGGAAAGGAAGTGGCCAGCCTTTCGAGGGAATACAGAATATG
KikGR         CACAAGTTCGTGATTACAGGGAAAGGAAGTGGCCAGCCTTTCGAGGGAATACAGAATGTG

KikG          GACCTGACAGTCATAGAGGGCGGACCTCTTCCTTTTGCTTTCGATATCCTGACAACAGTA
KikGR         GACCTGACAGTCATAGAGGGCGGACCTCTTCCTTTTGCTTTCGATATCCTGACAACAGCA

KikG          TTCGATTACGGCAACCGGGTATTTGTCAAATACCCAGAAGAAATAGTAGACTACTTCAAG
KikGR         TTCCATTACGGCAACCGGGTATTTGTCGAATACCCAGAAGAAATAGTAGACTACTTCAAG

KikG          CAGTCGTTTCCTGAGGGTTATTCTTGGGAACGAAGCATGAGTTACGAAGACGGGGGAATT
KikGR         CAGTCGTTTCCTGAGGGTTATTCTTGGGAACGAAGCATGAGTTACGAAGACGGGGGAATT

KikG          TGCCTCGCCACAAACAATATAACGATGAAGAAAGACGGCAGCAACTGTTTTGTCTATGAA
KikGR         TGCCTCGCCACAAACAATATAACGATGAAGAAAGACGGCAGCAACTGTTTTGTCAATGAA

KikG          ATTCGATTTGATGGTGTGAACTTTCCTGCCAATGGTCCAGTTATGCAGAGGAAGACCGTC
KikGR         ATTCGATTTGATGGTGTGAACTTTCCTGCCAATGGTCCAGTTATGCAGAGGAAGACCGTC

KikG          AAATGGGAGCCATCCACTGAGAAAATGTATGTGCGTGATGGAGTGCTGAAGGGTGATGTT
KikGR         AAATGGGAGCCATCCACTGAGAAAATGTATGTGCGTGATGGAGTGCTGAAGGGTGATGTA

KikG          AACATGGCTCTGTTGCTTCAAGGAGGTGGCCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTAC
KikGR         AACATGGCTCTGTTGCTTCAAGGAGGTGGCCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTAC

KikG          AAAGCAAAGAAGGTTGTCCAGTTGCCAGACTATCACTTCGTGGATCATCGAATTGAGATA
KikGR         AAAGCAAAGAAGGTTGTCCAGTTGCCAGACTATCACTTCGTGGATCATCAAATGGAGATA

KikG          ACAAGCCATGACAAGGATTACAACAAGGTTAAGCTGTATGAGCATGCTAAAGCTCATTCC
KikGR         ACAAGCCATGACAAGGATTACAACAAGGTTAAGCTGTATGAGCATGCTAAAGCTCATTCC

KikG          GGGCTGCCAAGGCTGGCCAAGTAA
KikGR         GGGCTGCCAAGGCTGGCCAAGTAA
```

※解答編シート（＊は KikG と KikGR とで同一塩基であることを示しています。＊の空いている部分が塩基の異なる部分です。全部で 9 か所あります。そのうち、アミノ酸の種類が異なるのは 8 か所です。）

```
KikG       ATGAGTGTGATTACATCAGAAATGAAGATGGAGCTGCGTATGGAAGGCGCTGTAAACGGG
KikGR      ATGAGTGTGATTACATCAGAAATGAAGATCGAGCTGCGTATGGAAGGCGCTGTAAACGGG
           ***************************** ******************************

KikG       CACAAGTTCGTGATTACAGGGAAAGGAAGTGGCCAGCCTTTCGAGGGAATACAGAATATG
KikGR      CACAAGTTCGTGATTACAGGGAAAGGAAGTGGCCAGCCTTTCGAGGGAATACAGAATGTG
           ********************************************************* **

KikG       GACCTGACAGTCATAGAGGGCGGACCTCTTCCTTTTGCTTTCGATATCCTGACAACAGTA
KikGR      GACCTGACAGTCATAGAGGGCGGACCTCTTCCTTTTGCTTTCGATATCCTGACAACAGCA
           ********************************************************** *

KikG       TTCGATTACGGCAACCGGGTATTTGTCAAATACCCAGAAGAAATAGTAGACTACTTCAAG
KikGR      TTCCATTACGGCAACCGGGTATTTGTCGAATACCCAGAAGAAATAGTAGACTACTTCAAG
           *** *********************** ********************************

KikG       CAGTCGTTTCCTGAGGGTTATTCTTGGGAACGAAGCATGAGTTACGAAGACGGGGGAATT
KikGR      CAGTCGTTTCCTGAGGGTTATTCTTGGGAACGAAGCATGAGTTACGAAGACGGGGGAATT
           ************************************************************

KikG       TGCCTCGCCACAAACAATATAACGATGAAGAAAGACGGCAGCAACTGTTTTGTCTATGAA
KikGR      TGCCTCGCCACAAACAATATAACGATGAAGAAAGACGGCAGCAACTGTTTTGTCAATGAA
           ******************************************************* *****

KikG       ATTCGATTTGATGGTGTGAACTTTCCTGCCAATGGTCCAGTTATGCAGAGGAAGACCGTC
KikGR      ATTCGATTTGATGGTGTGAACTTTCCTGCCAATGGTCCAGTTATGCAGAGGAAGACCGTC
           ************************************************************

KikG       AAATGGGAGCCATCCACTGAGAAAATGTATGTGCGTGATGGAGTGCTGAAGGGTGATGTT
KikGR      AAATGGGAGCCATCCACTGAGAAAATGTATGTGCGTGATGGAGTGCTGAAGGGTGATGTA
           *********************************************************** 

KikG       AACATGGCTCTGTTGCTTCAAGGAGGTGGCCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTAC
KikGR      AACATGGCTCTGTTGCTTCAAGGAGGTGGCCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTAC
           ************************************************************

KikG       AAAGCAAAGAAGGTTGTCCAGTTGCCAGACTATCACTTCGTGGATCATCGAATTGAGATA
KikGR      AAAGCAAAGAAGGTTGTCCAGTTGCCAGACTATCACTTCGTGGATCATCAAATGGAGATA
           ************************************************* *** ******

KikG       ACAAGCCATGACAAGGATTACAACAAGGTTAAGCTGTATGAGCATGCTAAAGCTCATTCC
KikGR      ACAAGCCATGACAAGGATTACAACAAGGTTAAGCTGTATGAGCATGCTAAAGCTCATTCC
           ************************************************************

KikG       GGGCTGCCAAGGCTGGCCAAGTAA
KikGR      GGGCTGCCAAGGCTGGCCAAGTAA
           ************************
```

KikG、KikGR 遺伝子の取り扱いに関して

KikG および KikGR の権利は独立行政法人理化学研究所に所属しますので、本説明書に記載されているプラスミドを大腸菌に導入して蛍光を確認する以外の目的にプラスミドおよび遺伝子配列を利用することを禁じます。

免責事項

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート『バイオレスキュー』

ご購入後 3 か月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等でバイオの研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Science シリーズ　カスタマーサポート係

TEL：03-6277-8041

FAX：03-6277-8042

Mail：ed-kit@leaveanest.com

キット開発にあたって

本キットは独立行政法人理化学研究所の研究成果をもとに開発を行っております。

製造・販売元

お問い合せ先

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6　VARCA 四谷 10 階
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL：http://www.leaveanest.com/